

(51) Internationale Patentklassifikation⁶:

G01N 21/64

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/57151

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

17. Dezember 1998 (17.12.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/03535

(22) Internationales Anmeldedatum:

11. Juni 1998 (11.06.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 25 050.5

13. Juni 1997 (13.06.97)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE); INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE HOCHTECHNOLOGIE [DE/DE]; Helmholtzweg 4, D-07743 Jena (DE).

(72) Erfinder, und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KARTHE, Wolfgang [DE/DE]; Kastanienstrasse 1, D-07747 Jena (DE). BRÄUER, Andreas [DE/DE]; Rabis 9, D-07646 Schlöben (DE). HISMANN, Frank [DE/DE]; Camsdorfer Strasse 5, D-07749 Jena (DE). KÖHLER, Michael [DE/DE]; Untergasse 8, D-07751 Golmsdorf (DE). WALDHÄUSL, Ralf [DE/DE]; Tatzendpromenade 30, D-07745 Jena (DE). DANZ, Norbert [DE/DE]; Pforte 2, D-07747 Jena (DE).

(74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR; Gostritzer Strasse 61-63, D-01217 Dresden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: DEVICE FOR DETECTING BIOCHEMICAL OR CHEMICAL SUBSTANCES BY FLUORESCENCE EXCITATION AND METHOD FOR ITS PRODUCTION

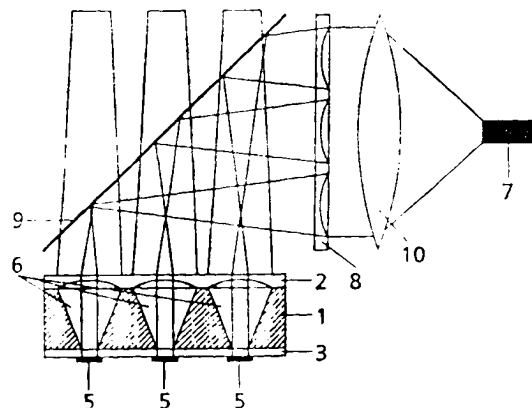
(54) Bezeichnung: ANORDNUNG ZUR DETEKTION BIOCHEMISCHER ODER CHEMISCHER SUBSTANZEN MITTELS FLUORESZENZLICHTANREGUNG UND VERFAHREN ZU DESSEN HERSTELLUNG

(57) Abstract

The invention relates to a device for detecting biochemical or chemical substances by fluorescence excitation and a method for its production. This method can be applied in various areas, for example in biotechnology, molecular biology, in the development of pharmaceuticals as well as for analysing various chemical substances. With this relatively simple device, detection of a large number of samples can be carried out quickly and with a high degree of precision. To this end, a plate-shaped substrate (1) with locally defined structure is used for detecting the different samples (5). A lens array (2) fitted on detector side and configured in accordance with the structure is preferably used to image the fluorescent light of the different samples on a detector array. A detector array adapted to the structure of the substrate can also be placed or mounted on the substrate.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Anordnung zur Detektion biochemischer oder chemischer Substanzen mittels Fluoreszenzlichtanregung und ein Verfahren zu deren Herstellung, das auf verschiedenen Gebieten, wie z.B.



⁶ Diese Klassifikation ist ausschließlich zu Informationszwecken angegeben.

Es besteht aber auch die Möglichkeit, ein der Strukturierung des Substrates

entsprechendes Detektorarray auf das Substrat anzusetzen bzw.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PL	Polen		
CN	China	KZ	Kasachstan	PT	Portugal		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SE	Schweden		
EE	Estland			SG	Singapur		

5

10

15

**Anordnung zur Detektion biochemischer oder chemischer
Substanzen mittels Fluoreszenzlichtanregung
und Verfahren zu dessen Herstellung**

20 Die Erfindung betrifft eine Anordnung zur Detektion
biochemischer oder chemischer Substanzen mittels
Fluoreszenzlichtanregung und Verfahren zur Herstel-
lung einer solchen Anordnung. Die erfindungsgemäße
Anordnung ist auf verschiedenen Gebieten, wie z.B. in
25 der Biotechnologie, der Molekularmedizin, bei der
Pharmaentwicklung und auch bei der Analyse verschie-
dener chemischer Substanzen einsetzbar.

30 Seit geraumer Zeit werden die verschiedensten opti-
schen Verfahren und Systeme z.B. bei der Erforschung
verschiedener biologischer Systeme und Prozesse, in
der Mikrobiologie, der Molekularmedizin eingesetzt.
Dabei werden häufig Spektrometer verwendet, die einen

spektrometrischen Detektor aufweisen.

Die herkömmlichen Verfahren zur Detektion von Substanzen sind
tineuntersuchungen ungeeignet, da eine aufwendige
Präparation der einzelnen Proben erforderlich ist.

die für die Messungen benötigten Zeiten zu lang sind und zur Denaturierung der Proben führen können.

5 Für viele Anwendungsfälle sind Lösungen gefordert, mit denen eine schnelle, genaue und preiswerte Analyse einer sehr großen Anzahl von Proben (in einer Größenordnung von ca. 10^6) durchgeführt werden können. Solche Anwendungen sind beispielsweise DNA-Bibliotheken.

10

Für die Analyse bzw. Detektion wurden bisher verschiedene Meßverfahren angewendet. So wurde beispielsweise die Absorptionsänderung, die Brechzahländerung oder das angeregte Fluoreszenzlicht bestimmt. Bei der Messung der Intensität von Fluoreszenzlicht kann das Anregungslicht und das modifizierte Fluoreszenzlicht parallel oder senkrecht zueinander geleitet werden. Werden die beiden verschiedenen Lichtarten senkrecht zueinander geleitet, wird die Ausbildung eines evaneszenten Feldes an einem Wellenlichtleiter ausgenutzt. Diese Form wird z.B. für den Nachweis von Antigen-Antikörper-Reaktionen ausgenutzt. Bei diesen sogenannten "solid-phase fluoroimmunoassays" werden nachweisspezifische Antikörper auf einer Sensoroberfläche immobilisiert. Der Analyt (Antigen) wird an einen entsprechenden Antikörper gebunden und kann dann, entweder direkt oder unter Verwendung eines Markierungsstoffes durch das evaneszente Feld fluoresziert, nachgewiesen werden. Die Anregung der Fluoreszenz durch das evaneszente Feld eines Wellenleiters bietet den Vorteil, daß die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes begrenzt ist (ca. 100 bis 200 nm) und dadurch lediglich die direkt an der Sensorfläche gebundenen Analyten oder Markierungsstoffe angeregt werden. Das führt dazu, daß die meßbare In-

35

tensität des Fluoreszenzlichtes ein direktes Maß für die Anzahl bzw. den Anteil an gebundenem Analyt bzw. Markierungsstoff ist und aus diesem Grunde auf zusätzliche Spülvorgänge, um ungebundene Markierungsstoffmoleküle zu entfernen, verzichtet werden kann.

Für solche Lichtwellenleiter können sowohl Lichtleitfasern als auch Schichtwellenleiter eingesetzt werden. Lichtleitfasern haben den Vorteil, daß entsprechende Sensoren bzw. Vorrichtungen einfach und kostengünstig herstellbar sind. Sie können an nahezu beliebigen und auch schwer zugänglichen Orten eingesetzt werden und die Meßsignale sind über bestimmte Entfernungen ohne weiteres optisch übertragbar. So ist es beispielsweise aus US 4,447,546 und US 4,909,990 bekannt, daß Lichtleitfasern für entsprechende Verfahren zwar prinzipiell einsetzbar sind, in der Regel jedoch ebene Schichtwellenleiter verwendet werden.

Die ebenen Schichtwellenleiter haben den Vorteil, daß die verschiedensten zur Analyse anstehenden Substanzen und gegebenenfalls erforderliche Immobilisierungsschichten einfach aufgebracht und strukturiert werden können. Mögliche Verfahren hierzu sind z.B. Schleudern, Gießen, Sputtern oder bekannte Vakuumverdampfungsverfahren. Außerdem können mehrere einzelne Sensoren aus einer einzigen großen Platte hergestellt werden, wobei die so hergestellten Sensoren nahezu gleiche Eigenschaften aufweisen. Ein weiterer Vorteil solcher Sensorstrukturen besteht darin, daß sie sehr stabil und demzufolge auch gut handhabbar sind. Es können die verschiedensten Schichtmaterialien einfach

setzt werden.

5 Ebene plattenförmige Gebilde können ohne weiteres in Nachweisgeräte eingesetzt und dort die optischen Meßverfahren durchgeführt werden.

10 Die Herstellung und Strukturierung solcher ebenen Gebilde ist durch den Vorlauf aus der Mikroelektronikfertigung bewährt und demzufolge auch mit relativ geringen Kosten verbunden.

15 Biologische Sensorstrukturen, die die Ausbildung evaneszenter Felder für die Fluoreszenzlichtanregung ausnutzen, sind beispielsweise von S. Sjölander und C. Urbaniczky: Integrated Fluid Handling System for Biomolekular Analysis, Anal. Chem., 63 81991) 2338 - 2345 und R. Cush et al: The resonant mirror: a novel optic biosensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part 1: principles of operation and associated instrumentation. Biosensors Bioelectron., 8 20 (1993) 347 - 353 und J.E. Fletcher et al: A Rapid, Biosensor-based, assay for PSA in Whole Blood, Tumor Marker Update Vol. 5, No. 5 (1993). So liegen die Nachweisgrenzen, bei dem von S. Sjölander und C. Urbaniczky beschriebenen Sensor bei 0,5 ng/ml (FCFD). 25

30 Eine weitere Vorrichtung für den Fluoreszenznachweis biologischer Reaktionen mittels Evaneszenzfeldanregung eines Schichtwellenleiters ist in WO 94/27137 beschrieben, wobei dort eine Nachweisgrenze bei Verwendung eines Referenzkanals bei 10^{-13} molaren Lösungen liegt.

35 Bei dieser Lösung wird ein planarer Wellenleiter verwendet, an dessen Oberfläche voneinander getrennte

Felder vorgesehen sind, auf bzw. in denen Fängermoleküle immobilisiert sind und für die verschiedenen Felder auch verschiedene Proben mittels Evaneszenzfeldanregung in Form von Fluoreszenzimmunoassays bestimmt werden können. Dabei wird das Licht zwingend über eine Stirnfläche des planaren Wellenleiters, in einer bevorzugten Ausführung über eine linsenförmige Ausbildung dieser Stirnfläche, in den planaren Wellenleiter eingekoppelt und an der Grenzfläche das evaneszente Feld ausgebildet und Fluoreszenz angeregt. Das Fluoreszenzlicht tritt an der gegenüberliegenden Seite des Wellenleiters aus und kann mit den üblichen Detektoren gemessen werden, wobei die Strahlführung mit verschiedenen optischen Elementen beeinflusst werden kann. Dadurch treten zwei wichtige Nachteile auf, die die Meßempfindlichkeit, wie bereits erwähnt, negativ beeinflussen. Zum einen ist eine Beeinflussung des Fluoreszenzlichtes verschiedener Proben, die in den Feldern enthalten sind, nicht auszuschließen, da eine vollständige optische Trennung nicht möglich ist und zum anderen treten Probleme durch die ausschließliche Einkopplung des Lichtes über die Stirnseite des Wellenleiters auf, so daß größere Lichtverluste in Kauf genommen werden müssen.

Zur Verringerung des Streulichteinflusses wird dort zwar die Verwendung von entsprechenden optischen Filtern vorgeschlagen, die jedoch ebenfalls Fluoreszenzlichtverluste hervorrufen und die bereits erwähnte Beeinflussung des Fluoreszenzlichtes der verschiedenen Proben nicht vollständig verhindern können.

In der EP 0 519 622 A2 ist eine andere Vorrichtung

verwendet werden soll, wobei das Licht für die Fluoreszenzanregung über eine ebene oder gewölbte Fläche des schalenförmigen Sensors in die Mantelfläche des Sensors eingekoppelt und die Fluoreszenz in der auf die äußere Mantelfläche des Sensors aufgebrachten Probe angeregt wird. Das Fluoreszenzlicht gelangt wieder über die Mantelfläche des schalenförmigen Sensors und die ebene bzw. gewölbte Fläche, über die das Anregungslicht in die Mantelfläche des Sensors eingekoppelt wird, über ein optisches System zu einem Detektor, mit dem die Intensität des Fluoreszenzlichtes bestimmt werden kann. Dabei wird nach einem Ausführungsbeispiel das Anregungslicht über einen halbdurchlässigen Spiegel in den Sensor eingekoppelt und das Fluoreszenzlicht durch den halbdurchlässigen Spiegel auf den Detektor gerichtet. Mit einer solchen Vorrichtung kann prinzipiell gleichzeitig nur eine einzige Probe detektiert werden.

In WO 95/03538 ist ein optischer Biosensor beschrieben, bei dem eine Lochplatte, deren Löcher in einer Matrixanordnung ausgebildet sind, in Verbindung mit einem planaren Wellenleiter und einer Grundplatte beschrieben. Das Licht einer Lichtquelle wird auf die Grundplatte gerichtet und über den Löchern der Lochplatte ausgebildete Beugungsgitter in den Wellenleiterfilm eingekoppelt. Durch die in den Löchern aufgenommenen Proben tritt eine Änderung des Brechungsindex des Wellenleiterfilms auf, der zu einer Veränderung des Winkels des austretenden Lichtes führt, die als Meßwert ausgenutzt wird.

In der DE 41 15 414 A1 ist ein miniaturisiertes Chemo- und Biosensorelement mit ionenselektiver Membran beschrieben, das in einem Siliciumsubstrat sich ver-

jüngende Öffnungen aufweist und in das so erhaltene Containment eine Flüssigkeit, mit der eine ionenselektive Membran ausgebildet werden kann, eingefüllt wird.

5

Die Lösungen, die von S. Sjölander und C. Urbaniczky sowie R. Cush et al beschrieben worden sind, weisen Brechzahländerungen nach, die durch eine Anlagerung von Analyten an einer Oberfläche hervorgerufen werden. Die gemessene Brechzahländerung beinhaltet jedoch nicht ausschließlich die jeweils zu untersuchende Anlagerung und die erreichbare Selektivität ist demzufolge nicht in jedem Fall gegeben. Für die entsprechend durchgeführten Messungen ist ein sehr hoher apparativer Aufwand erforderlich, der sich auch in relativ hohen Kosten widerspiegelt. Untersuchungen mehrerer Proben, die gleichzeitig durchgeführt werden können, ist nicht möglich.

10

15

20

Bei dem von J.E. Fletcher et al beschriebenen Biosensor bewirkt die relativ großflächige Anregung der Fluoreszenz und deren evaneszentes Einkoppeln in einen Schichtwellenleiter im FCFD eine relativ geringe Empfindlichkeit.

25

30

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, eine Möglichkeit zu schaffen, mit der relativ einfach und mit hoher Genauigkeit die Detektion an einer großen Anzahl von Proben in sehr kurzer Zeit durchgeführt werden kann.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruchs 1 gelöst.

chen aus einem plattenförmigen Substrat, das zur Detektion mehrerer Proben lokal strukturiert ist, wobei die Strukturierung bevorzugt in Form eines zweidimensionalen Arrays, wie sie beispielsweise von den bekannten Mikrotiterplatten bekannt ist, ausgebildet werden soll.

Entsprechend der im Substrat oder der nur in einer Pufferschicht ausgebildeten Strukturierung kann detektorseitig ein Linsenarray aufgesetzt werden, wobei die Strukturierung und auch das Linsenarray sehr klein ausgebildet sein können, so daß auf einem kleinflächigen Substrat eine große Anzahl von auf verschiedenen Proben aufgebracht und detektiert werden können. An Stelle des Linsenarrays kann aber auch eine der Strukturierung angepaßte Linse, z.B. eine Fresnellinse hierfür verwendet werden. Auf der dem Linsenarray abgewandten Seite des Substrates kann eine Pufferschicht und ein entsprechend der im Substrat eingearbeiteten Strukturierung ausgebildetes Wellenleiterarray aufgebracht werden.

Jede der im Substrat eingearbeiteten Mikrostruktur definiert einen Fluoreszenzanregungs- und -nachweis- kanal für jeweils eine der zu detektierenden Proben.

Für die Anregung des Fluoreszenzlichtes bestehen prinzipiell zwei Möglichkeiten, so kann einmal das evaneszente Feld in einem Wellenleiterarray ausgebildet werden, das auf der Seite des Substrates ausgebildet ist, die der Detektorseite gegenüberliegt. Die zweite Möglichkeit der Anregung besteht darin, das Anregungslicht über das der Strukturierung im Substrat angepaßte Linsenarray auf die einzelnen Proben zu richten, wobei in jedem Fall das Fluoreszenzlicht

über das am Substrat detektorseitig angeordnete Lin-
senarray auf dem Detektor abgebildet werden kann. Der
Detektor ist hierfür ebenfalls in Form eines Arrays,
z.B. als CCD-Array ausgebildet, so daß das Fluores-
zenzlicht jeder einzelnen Probe gesondert detektiert
werden kann.

Für den Fall der Evaneszenzfeldanregung besteht aber
auch die Möglichkeit, auf das Linsenarray zu verzich-
ten und dafür ein der Strukturierung angepaßtes De-
tektorarray auf das Substrat aufzusetzen bzw. an die-
ses so anzordnen, daß die verschiedenen Proben selek-
tiv detektiert werden können.

Die Strukturierung der Substrate, die beispielsweise
aus der Halbleitertechnik bekannte Formate von
4''x 4'' aufweisen können, sind mit den dort bekann-
ten Bearbeitungsverfahren für Silicium einfach und
kostengünstig herstellbar, dabei kann auf einem sol-
chen Substrat eine Mikrostrukturierung erreicht wer-
den, die eine Probenanzahl von bis zu $10^6/\text{cm}^2$ ermög-
licht.

Das erfindungsgemäß zu verwendende Substrat kann ver-
teilhaft sichern, daß die verschiedensten Fluores-
zenzlichtsignale, die mit dem Detektorarray ausgewer-
tet werden sollen, sich nicht gegenseitig beeinflus-
sen bzw. überlagern, so daß jeder Probe ein eindeuti-
ger Meßwert ohne Störgrößen zugeordnet werden kann.
Hierfür besteht das Substrat bevorzugt aus einem Ma-
terial, das bei der/den Lichtwellenlängen des Fluo-
reszenzlichtes dieses absorbiert. Für die gleiche
Wirkung besteht jedoch die Möglichkeit, die jeweili-

Effekt vermieden werden kann.

Die bevorzugte Strukturierung im Substrat, durch Ausbildung von pyramiden- oder kegelförmigen oder auch senkrechten Durchbrüchen hat weiter den Vorteil, daß das Fluoreszenzlicht günstig reflektiert und dadurch gesammelt in Richtung auf das Linsenarray und demzufolge auch auf die jeweiligen Detektoren gerichtet werden kann.

Mit der erfindungsgemäßen Anordnung ist die Detektion von Molekülkonzentrationen, die 10^{-12} molar oder geringer sind, in großer Anzahl für verschiedene Proben in sehr kurzer Zeit möglich. Außerdem kann das anregende Licht exakt definiert auf die jeweilige Probe gerichtet und das jeweils entsprechende Fluoreszenzlicht, bei weitestgehender Vermeidung von Streulichtanteilen oder anderen Störgrößen direkt auf den jeweiligen einer einzigen Probe zugeordneten Detektor gerichtet und der entsprechende Analyt gegebenenfalls auch quantitativ bestimmt werden.

Mit der erfindungsgemäßen Lösung kann nicht nur eine verbesserte orts aufgelöste Messung durchgeführt werden, es besteht optional die Möglichkeit mit einer entsprechenden zeitlich steuerbaren Detektoranordnung (z.B. triggerbare CCD-Kamera und elektronische Verzögerungseinheit) auch zeitaufgelöste Messungen durchzuführen.

Nachfolgend soll die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher beschrieben werden.

Dabei zeigen:

- Figur 1 ein Ausführungsbeispiel einer erfindungs-
gemäßen Anordnung mit Fluoreszenzanregung
über evaneszentes Feld;
- 5 Figur 2 ein zweites Ausführungsbeispiel einer er-
findungsgemäßen Anordnung mit Fluoreszenz-
anregung über Mikrolinsenarray;
- Figur 3a eine Anordnung nach Figur 1 mit und ohne
Linsenarray; Probe auf der umstrukturierten
Seite;
- 10 Figur 3b eine Anordnung mit bis zur Wellenleiter-
schicht reichenden Durchbrüchen mit und
ohne Linsenarray, und Proben in Durchbrü-
chen;
- Figur 4a eine Anordnung mit zusätzlicher Zwischen-
schicht und unterhalb von Wellenleiter und
15 Substrat angeordneten Proben;
- Figur 4b eine Anordnung mit zusätzlicher Zwischen-
schicht und oberhalb des/der Wellenleiter
angeordneten Proben und
- 20 Figur 5 eine Anordnung mit einer strukturierten
Pufferschicht.

Bei dem in der Figur 1 dargestellten Beispiel einer
erfindungsgemäßen Anordnung wird ein Siliciumsubstrat
25 1, z.B. ein bekannter Siliciumwafer verwendet, der
einseitig mit einem Schichtpaket aus dotiertem Sili-
ciumdioxid oder einem anderen Silikat versehen wird,
dargestellt. Dabei besteht das Schichtpaket aus einer
Pufferschicht 3 und einer Wellenleiterschicht 4.

30

Auf der entgegengesetzten Seite, also der Seite, die
zu einem nicht dargestellten Detektorarray weist,
Durchbrüche 6 in Form eines regelmäßigen Arrays im

einggebracht werden, wobei das Siliciumdioxid als Ätzstoppschicht wirkt und demzufolge die Durchbrüche 6 an der Siliciumdioxidschicht, also an der Pufferschicht 3 enden.

5

Die Durchbrüche 6 können dabei Pyramiden- und Kegelform oder auch Quaderform aufweisen, und dienen zur Trennung der verschiedenen Fluoreszenzlichtstrahlen für die jeweiligen Proben 5, die unterhalb der Wellenleiterschicht 4 den Durchbrüchen 6 zugeordnet und bevorzugt unter Verwendung von jeweils selektiven Immobilisierungsschichten aufgebracht sind. Die Proben 5 können dabei, je nachdem, sowohl flüssige als auch feste Konsistenz aufweisen.

15

Erfolgt die Fluoreszenzanregung über das evaneszente Feld der Wellenleiter 4, wird das Fluoreszenzlicht für jede Probe 5 durch die entsprechende Durchbrechung 6 über eine der Linsen des Linsenarrays 2 auf einen Detektor eines Detektorarrays gerichtet, wobei jeweils ein Einzeldetektor des Detektorarrays einer Probe 5 zugeordnet ist und demzufolge die Intensität einer Fluoreszenz für jeweils eine Probe 5 gemessen werden kann.

25

Neben Silicium können auch andere Substratmaterialien, wie z.B. verschiedene Polymere eingesetzt werden, die beispielsweise eingefärbt sind und so das Fluoreszenzlicht aus verschiedenen Proben absorbiert wird, so daß Übersprechen zwischen den Nachweiskanälen vermieden werden kann. Bei beispielsweise polymeren Substratmaterialien kann deren Strukturierung neben Ätzverfahren (Trockenätzverfahren) auch durch eine entsprechende Laserbearbeitung oder mittels Replikationstechniken erfolgen.

35

Bei dem in der Figur 2 dargestellten Beispiel einer erfindungsgemäßen Anordnung wird wiederum ein Substrat 1 mit einer Pufferschicht 3 versehen, an der verschiedene Proben 5 den jeweiligen Durchbrüchen 6 zugeordnet immobilisiert werden können. Innerhalb des Substrates 1, also wieder in Richtung auf den nicht dargestellten Detektorweisend, ist ein Linsenarray 2 mit jeweils einer einem Durchbruch 6 zugeordneter Einzellinse aufgesetzt, mit der Hilfe das Fluoreszenzlicht auf jeweils einen Detektor des Detektorarrays gerichtet werden kann.

Die Fluoreszenzanregung erfolgt durch Anwendung mindestens einer Lichtquelle 7, die bevorzugt ein Laser oder eine Laserdiode sein kann.

Erfolgt die Fluoreszenzanregung über ein Mikrolinsenarray, gelangt das Licht der Lichtquelle 7 über eine Optik 10 auf ein zweites Linsenarray 8 und wird von dort über einen halbdurchlässigen Spiegel 9 durch jeweils einen Durchbruch 6 auf eine einzelne Probe 5 gerichtet. Das Fluoreszenzlicht der jeweiligen Probe 5 kann den halbdurchlässigen Spiegel 9 in Richtung auf das nicht dargestellte Detektorarray passieren. Die Anzahl der einzelnen Linsen in den beiden Linsenarrays 2 und 8 ist identisch, wobei die Anordnung der einzelnen Linsen im Linsenarray 8 genau so gewählt wird, daß jeweils Licht, das durch eine Linse des zweiten Linsenarrays 8 über den halbdurchlässigen Spiegel 9 genau durch eine Durchbrechung 6 in Richtung auf eine Probe 5 zur Fluoreszenzlichtanregung gerichtet werden kann.

länge bzw. unterschiedlichen Wellenlängenspektrums aussenden, wobei hierfür günstigerweise jeweils getrennte zweite Lichtwellenarrays 8 verwendet werden.

5 Es besteht aber auch die Möglichkeit, vor bzw. nach den einzelnen Linsen der Linsenarrays 2 und 8 Filter und/oder Polarisatoren einzusetzen, um den Fehlereinfluß weiter zu verringern.

10 Die in den Figuren 1 und 3a gezeigte Anordnung mit der Wellenleiterschicht 4 wird in einem zusätzlichen Arbeitsgang, der von der Herstellung der Durchbrüche 6 unabhängig ist, mit einem Beschichtungs-, Maskierungs- und Strukturierungsprozeß behandelt, so daß
15 ein Streifenwellenleiterarray entsteht, dessen Struktur an die im Substrat 1 ausgebildete Struktur mit den Durchbrüchen 6 angepaßt ist.

Im Nachgang hierzu können dann unterschiedliche selektive Immobilisierungsschichten, den verschiedenen
20 Durchbrüchen 6 zugeordnet, aufgebracht werden, so daß jeweils unterschiedliche Analyten immobilisiert und detektiert werden können.

25 Vorteilhaft kann eine solche modifizierte Sensorfläche den Abfluß einer Durchflußmeßzelle bilden, durch die Proben- und Referenzlösung eingebracht werden können.

30 Ein weiteres Beispiel für eine erfindungsgemäße Anordnung ist in der Figur 3b gezeigt. Bei diesem Beispiel wurde auch die Siliciumdioxidpufferschicht 3 durchgeätzt und es entstanden Hohlräume für die Aufnahme von Proben. Dabei ist die Wellenleiterschicht 4
35 am Boden der jeweiligen Durchbrüche 6 mit einer Immo-

bilisierungsschicht für die verschiedenen Substanzen (Biomoleküle) versehen. In die Durchbrüche 6 können z.B. mit einer bekannten Pipettiervorrichtung die jeweiligen Proben eingebracht werden und die Fluoreszenzanregung so erfolgen, wie dies bei der Beschreibung der Figur 2 der Fall ist.

In den Figuren 4a und 4b sind mögliche Varianten für die Anordnung einer zusätzlichen Zwischenschicht 4a dargestellt, die die Immobilisierung der Proben verbessern sollen. Eine solche Zwischenschicht 4a ist aus einem für das Anregungslicht transparenten Material und wird mit einer kleinen Dicke (ca. 10 bis 50 nm) ausgebildet, die sicherstellt, daß die Ausbildung des evaneszenten Feldes nicht oder nur sehr geringfügig beeinflußt wird.

Geeignete Materialien sind z.B. Silikat, Quarz, die mit dem gleichen Verfahren aufgebracht werden können, mit dem auch die Wellenleiter ausgebildet werden. Es können aber auch optisch und biologisch bzw. chemisch geeignete Polymere als Zwischenschichtmaterial verwendet werden.

Bei dem Beispiel nach Figur 4b, kann eine solche Zwischenschicht 4a, in nicht dargestellter Weise, auch als dünner Flüssigkeitsfilm in den Durchbrechungen 6 im Substrat 1 unmittelbar zwischen Pufferschicht 3 und Probe 5 ausgebildet werden.

In der Darstellung nach Figur 4a sind die Proben 5 unterhalb der Wellenleiter 4 angeordnet, wobei die zusätzliche Zwischenschicht 4a zwischen den Proben 5

vorhanden. Bei diesem Beispiel ist eine Mikrooptik 11 optional über dem strukturierten Substrat 1 vor dem nicht dargestellten Detektor angeordnet.

- 5 Beim in der Figur 4b gezeigten Beispiel sind die Proben 5 in den Durchbrüchen 6 des Substrates 1 aufgenommen und zwischen Proben 5 und Pufferschicht 3 die Zwischenschicht 4a angeordnet.
- 10 Das in Figur 5 dargestellte Beispiel verwendet eine strukturierte Pufferschicht 3a, in der Durchbrüche 12 ausgebildet sind. Die Proben 5 können in diesen Durchbrüchen 12 wieder auf der zusätzlichen Zwischen-
- 15 schicht 4a immobilisiert werden. Der übrige Teil der entsprechenden Anordnung ist hier wieder aus den Einzelelementen Substrat 1 (auf das ggf. verzichtet werden kann), Wellenleiter 4 und Pufferschicht 3 gebildet, wobei hier das Substrat unstrukturiert sein kann.
- 20 Die mit den Durchbrüchen 12 versehene Pufferschicht 3a ist aus einem Material, das die Wellenleitung, wenn überhaupt nur geringfügig beeinflusst. Die Durchbrüche 12 sind so ausgebildet und dimensioniert, daß
- 25 das evaneszente Feld der Wellenleiter 4 im Bereich der Zwischenräume zwischen den Durchbrüchen 12 die Oberfläche der Pufferschicht 3 nicht erreicht und eine Beeinflussung des Fluoreszenzlichtes ausgeschlossen ist. Die Fluoreszenzanregung kann, wie bereits beschrieben erfolgen, und das Fluoreszenzlicht
- 30 tritt mit einer entsprechenden Apertur aus den Durchbrüchen 12 aus und kann mit der hier gezeigten Mikrooptik 11 oder einem Linsenarray 2 bzw. einer strukturierten Linse auf ein nicht gezeigtes Detektorarray zur orts aufgelösten Auswertung der einzelnen
- 35 Fluoreszenzintensitäten, gerichtet werden.

Patentansprüche

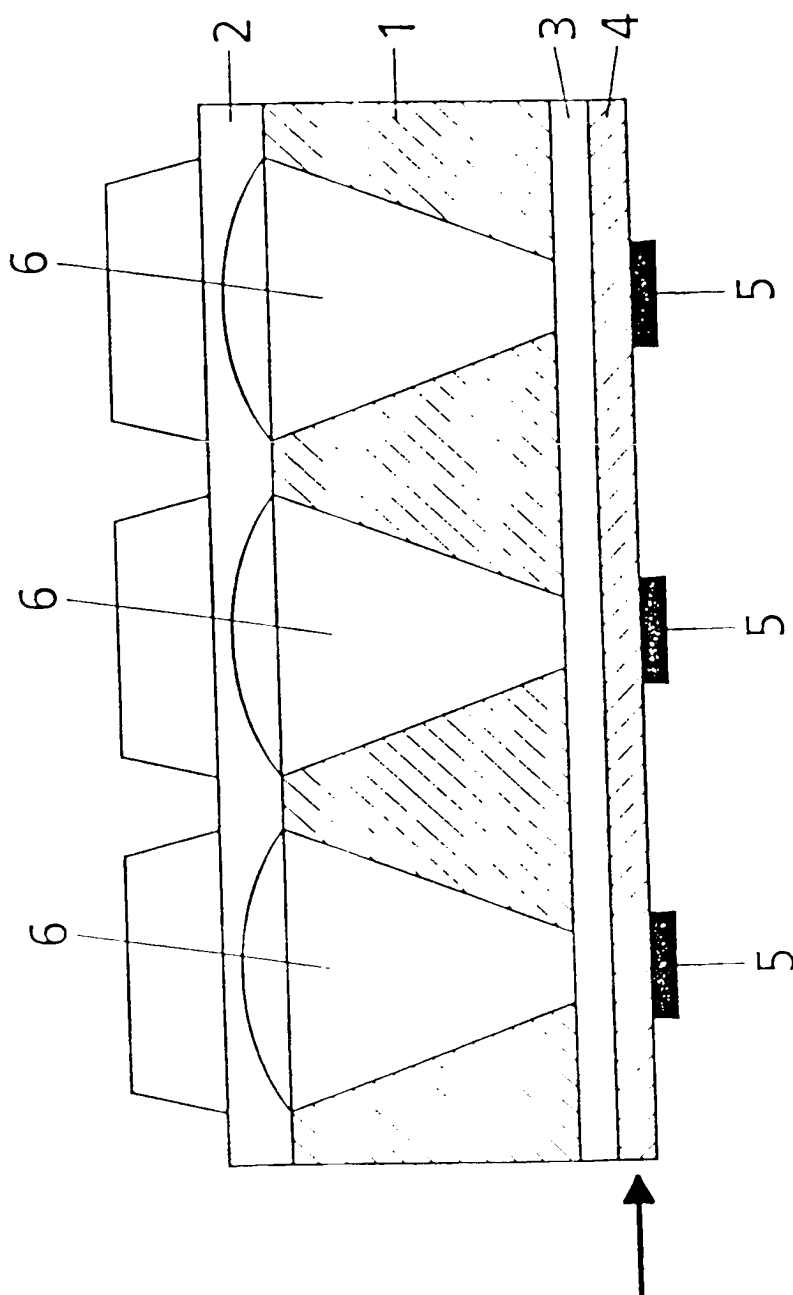
1. Anordnung zur Detektion biochemischer oder chemischer Substanzen mittels Fluoreszenzlichtanregung, bei der
5 ein plattenförmiges Substrat (1) oder eine Pufferschicht (3) zur Detektion verschiedener Proben (5) lokal definiert strukturiert ist und
10 detektorseitig ein der Strukturierung entsprechend ausgebildetes Linsenarray (2) oder eine der Strukturierung angepaßte Linse zur Abbildung des Fluoreszenzlichtes der verschiedenen Proben (5) vor einem Detektorarray angeordnet oder ein
15 der Strukturierung des Substrates (1) entsprechend ausgebildetes Detektorarray auf das Substrat (1) aufsetzbar ist, dadurch gekennzeichnet, daß die Strukturierung in Form von Durchbrüchen
20 (6) als Fluoreszenznachweiskanal und/oder Fluoreszenzanregungskanal für jeweils eine zu detektierende Probe ausgebildet ist.
2. Anordnung nach Anspruch 1,
25 dadurch gekennzeichnet, daß entsprechend der Strukturierung verschiedene selektive Immobilisierungsschichten aufgebracht sind.
3. Anordnung nach Anspruch 1 oder 2,
30 dadurch gekennzeichnet, daß die Durchbrüche (6) pyramiden- oder kegelförmig oder auch senkrecht und zumindest bis zu einer Pufferschicht (3) im Substrat (1) ausgebildet sind und die Pufferschicht

4. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß die Proben in den
Durchbrüchen (6) oder auf der ebenen Seite der
Anordnung gegenüber den Durchbrüchen (6) immobi-
lisiert sind.
- 5.
5. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat (1) aus
einem das Fluoreszenzlicht absorbierenden Mate-
rial besteht oder an seiner Oberfläche für Fluo-
reszenzlicht reflektierend oder absorbierend
ausgebildet ist.
- 10.
6. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet, daß die Wandungen der
Durchbrüche (6) Fluoreszenzlicht reflektieren.
- 15.
7. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet, daß die Anregung der
Fluoreszenz über das evaneszente Feld erfolgt.
- 20.
8. Anordnung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß auf der dem Linsen-
array (2) oder der Linse abgewandten Seite des
Substrates (1) ein Schichtpaket, bestehend aus
einer Pufferschicht (3) und mindestens einem
Wellenleiter (4) oder einer Strukturierung
angepaßten Wellenleiterarray (4) aufgebracht
ist.
- 25.
9. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat (1) aus
Silicium, Glas, glasartigem Material oder einem
Polymer und die Pufferschicht (3) und der/die
Wellenleiter (4) aus einem Silikat, Glas, glas-
- 30.
- 35.

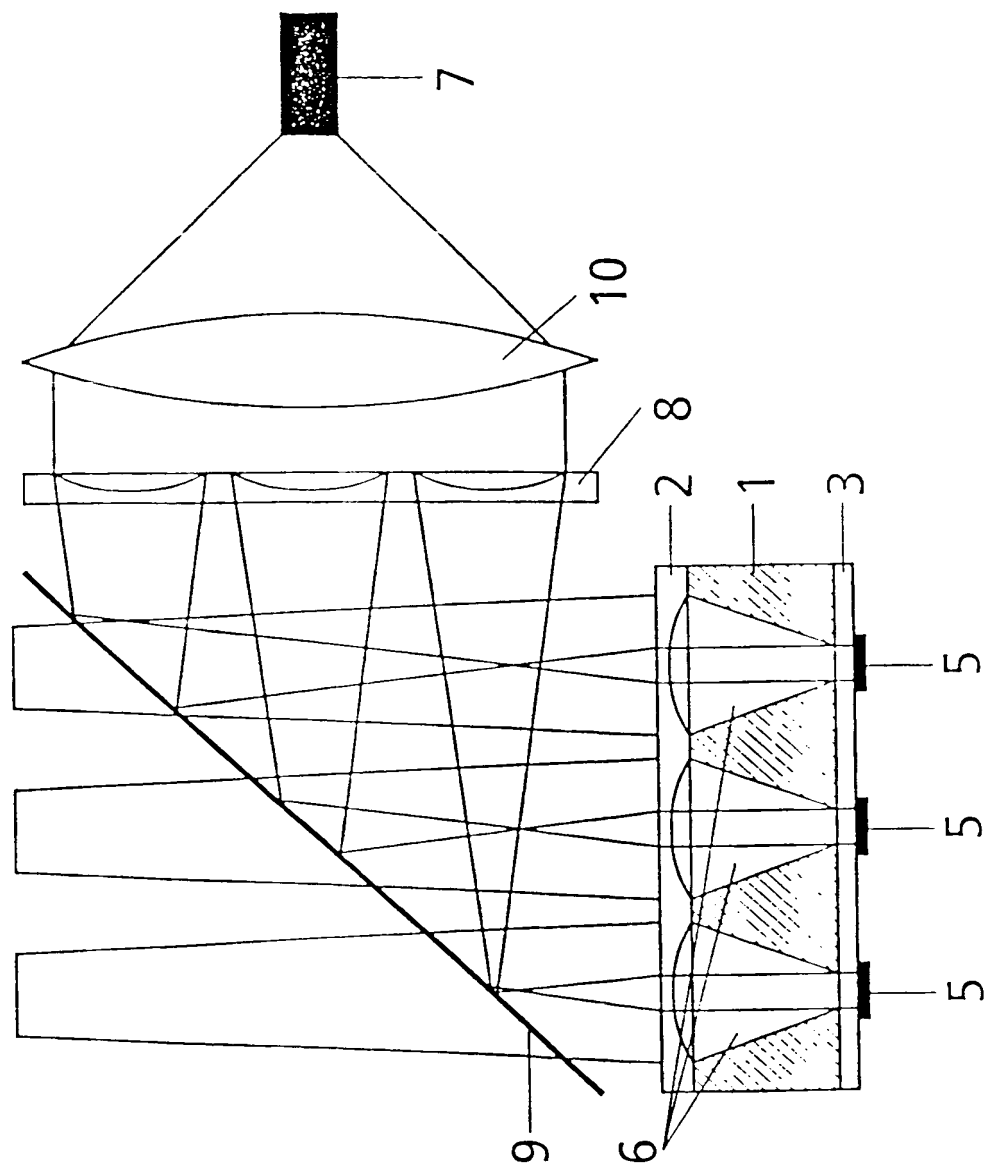
artigem Material oder einem Polymer bestehen.

10. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 6
dadurch gekennzeichnet, daß das Anregungslicht
mindestens einer Lichtquelle (7) über ein zweites
Linsenarray (8) oder eine der Strukturierung
angepaßte zweite Linse durch das erste Linsen-
array (2) oder die erste der Strukturierung an-
gepaßte Linse auf die Proben (5) gerichtet ist.
11. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet, daß zwischen dem ersten
und dem zweiten Linsenarray (2, 8) und/oder den
Linsen ein halbdurchlässiger Spiegel (9) ange-
ordnet ist.
12. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Wellenleiter
(4) eine für das Anregungslicht transparente
Zwischenschicht (4a), mit einer kleinen Dicke,
die die Evaneszenzfeldanregung nahezu nicht be-
einflußt, auf der die Proben immobilisieren,
angeordnet ist.
13. Verfahren zur Herstellung einer Anordnung nach
einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß auf einer Seite eines Substrates (1) eine
Pufferschicht (3) aufgebracht und im Substrat
(1), ausgehend von der hierzu abgewandten Seite
Durchbrechungen (6) zumindest bis zur Puffer-
schicht (3) ausgebildet werden.

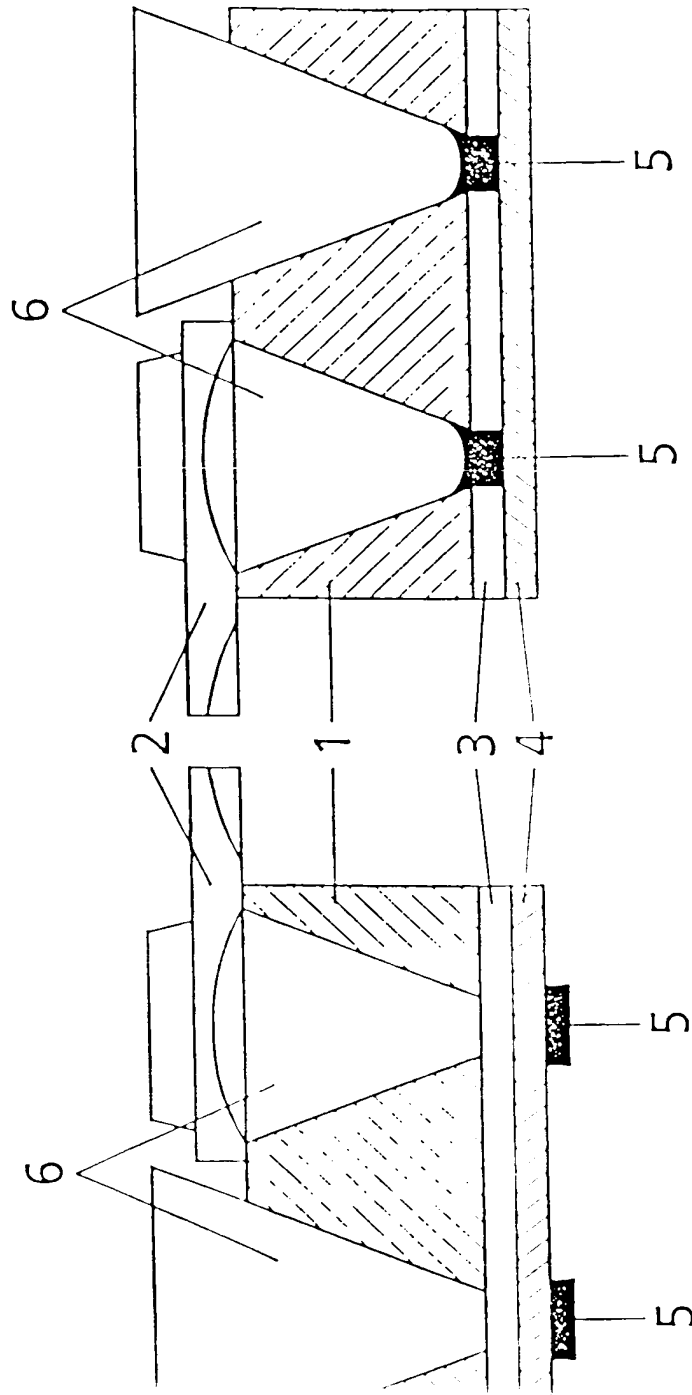
14. Verfahren zur Herstellung einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß auf einer Seite des Substrates (1) eine Puffer- und eine Wellenleiterschicht (3, 4) aufgebracht, im Substrat (1) ausgehend von der abgewandten Seite Durchbrechungen (6) zumindest bis zur Pufferschicht (3) ausgebildet werden und mit einem Strukturierungsverfahren ein Streifenwellenleiterarray (4) jeweils den Durchbrüchen (6) zugeordnet ausgebildet wird.
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14 dadurch gekennzeichnet, daß auf die Pufferschicht (3) oder die Streifenwellenleiterstruktur (4) verschiedene selektive Immobilisierungsschichten, den Durchbrüchen (6) zugeordnet, aufgebracht werden.
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Durchbrechungen (6) bis zur Streifenwellenleiterstruktur (4) ausgebildet und die verschiedenen Immobilisierungsschichten auf der Streifenwellenleiterstruktur (4) in den Durchbrüchen (6) aufgebracht werden.



Figur 1



Figur 2



Figur 3b

Figur 3a

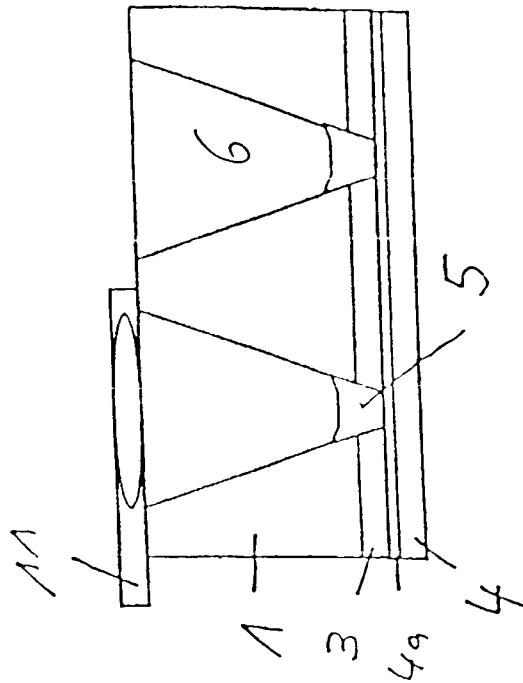


Figure 46

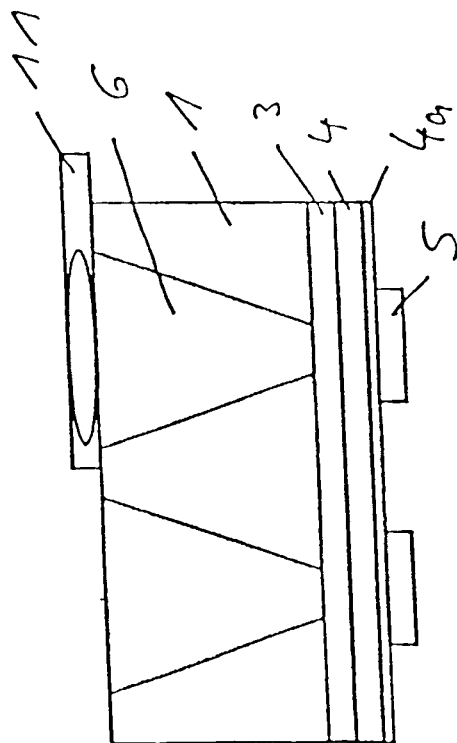
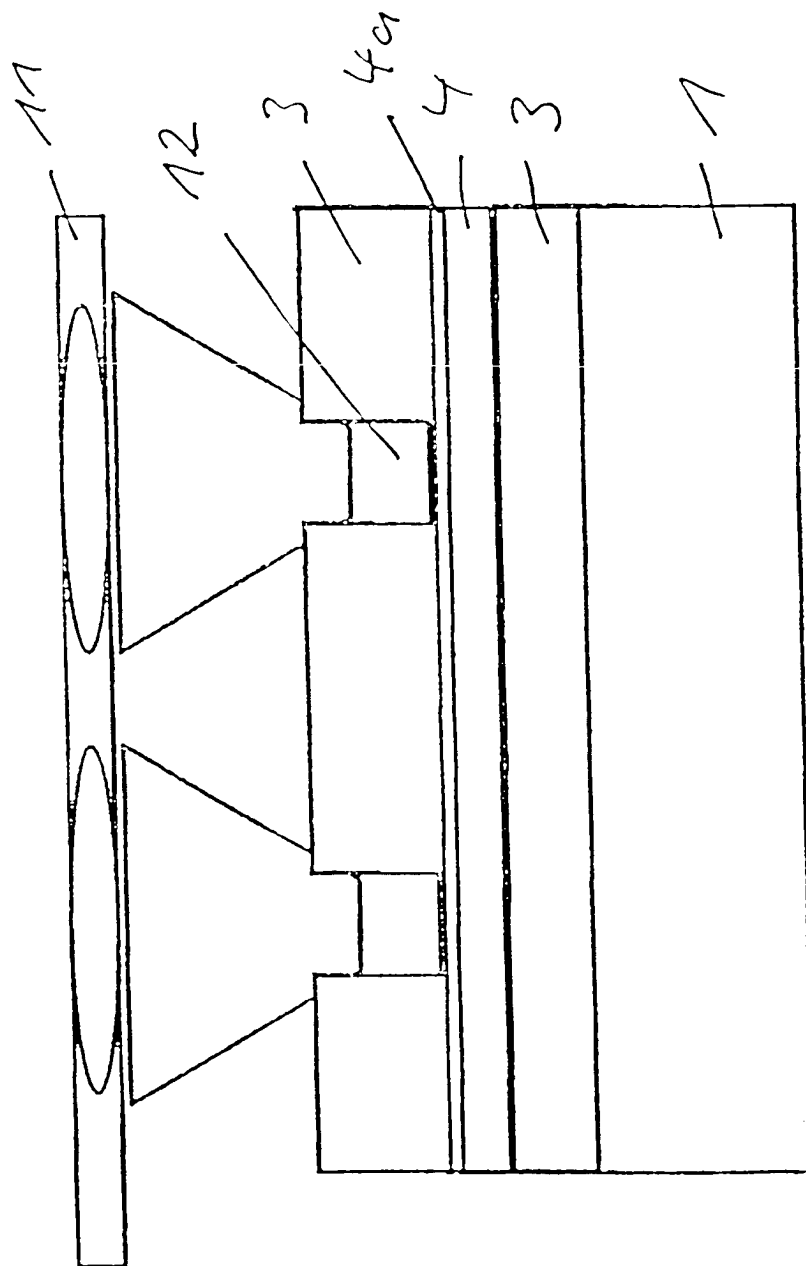


Figure 4a



Figur 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/03535

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to national classification and (IPC)

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 723 146 A (STANFORD RES INST INT), 24 July 1996 see page 4, line 26 - page 6, line 9 see page 22, line 39 - page 23, line 9 see figures 7A,7B ---	1,2,7,9, 12
Y	WO 95 03538 A (BALZERS HOCHVAKUUM ARTIFICIAL SENSING INSTR ASI A (CH); RUDIGIER) 2 February 1995 cited in the application see page 5, line 18 - page 6, line 20 see figures 1-3 ---	1,2,7,9, 12
A	EP 0 194 132 A (DX CO LTD) 10 September 1986 see page 2, line 22 - line 31 see page 4, line 9 - page 5, line 7 see page 15, line 23 - page 16, line 14 --- -/--	1



Further documents are listed in the continuation of box C



Patent family members are listed in annex

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 October 1998

Date of mailing of the international search report

21/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 eponl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Krametz, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 92/03535

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation to document with indication where appropriate of particular relevant features	Relevant to claim for
A	DE 41 15 414 A (KNOLL MEINHARD PROF DR) 12 November 1992 cited in the application see column 6, line 35 - line 65 see claims 1-3 ---	1.3.9.13
A	EP 0 519 622 A (CIBA CORNING DIAGNOSTICS CORP) 23 December 1992 cited in the application see column 4, line 43 - line 46 see column 10, line 20 - column 11, line 28 see figure 3 -----	11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 98/03535

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0723146 A	24-07-1996	AT 170004 T	15-09-1998
		CA 2144527 A	31-03-1994
		DE 69320484 D	24-09-1998
		EP 0660936 A	05-07-1995
		JP 8501632 T	20-02-1996
		WO 9407142 A	31-03-1994
		US 5674698 A	07-10-1997
		US 5736410 A	07-04-1998
WO 9503538 A	02-02-1995	EP 0660924 A	05-07-1995
		JP 8504955 T	28-05-1996
		US 5738825 A	14-04-1998
EP 0194132 A	10-09-1986	JP 61217745 A	27-09-1986
		US 5096807 A	17-03-1992
DE 4115414 A	12-11-1992	WO 9221020 A	26-11-1992
		EP 0538428 A	28-04-1993
		JP 8500178 T	06-01-1994
		US 5393401 A	28-02-1995
EP 0519622 A	23-12-1992	US 5156976 A	20-10-1992
		CA 2069538 A	08-12-1992
		JP 7174692 A	14-07-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

POI, EP 98/03535

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N21/64

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestsprichtwort Klassifikationssystem und Klassifikationszahl die
IPK 6 G01N

Recherchierte abgesehen vom Mindestsprichtwort gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbanken (Name der Datenbank) und evtl. verwendete Suchbegriffe

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 723 146 A (STANFORD RES INST INT) 24. Juli 1996 siehe Seite 4, Zeile 26 - Seite 6, Zeile 9 siehe Seite 22, Zeile 39 - Seite 23, Zeile 9 siehe Abbildungen 7A, 7B ---	1, 2, 7, 9, 12
Y	WO 95 03538 A (BALZERS HOCHVAKUUM ARTIFICIAL SENSING INSTR ASI A (CH); RUDIGIER) 2. Februar 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 5, Zeile 18 - Seite 6, Zeile 20 siehe Abbildungen 1-3 --- -/-	1, 2, 7, 9, 12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Einsichtnahme von Feld 1 zu entnehmen

☒ Keine Anhang Patentanfrage

Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A¹ Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E¹ älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

C¹ Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

D¹ Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

T¹ Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X¹ Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y¹ Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegender ist

Die in diesem Bericht enthaltenen Angaben sind nur für die Zwecke der internationalen Recherche und dienen nicht als rechtliche Beratung.

Die in diesem Bericht enthaltenen Angaben sind nur für die Zwecke der internationalen Recherche und dienen nicht als rechtliche Beratung.

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Beschreibung der Veröffentlichung ... weitergeordnet in einer Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>EP 0 194 132 A (DX CO LTD) 10. September 1986 siehe Seite 2, Zeile 22 - Zeile 31 siehe Seite 4, Zeile 9 - Seite 5, Zeile 7 siehe Seite 15, Zeile 23 - Seite 16, Zeile 14</p> <p>---</p>	1
A	<p>DE 41 15 414 A (KNOLL MEINHARD PROF DR) 12. November 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 6, Zeile 35 - Zeile 65 siehe Ansprüche 1-3</p> <p>---</p>	1,3,9,13
A	<p>EP 0 519 622 A (CIBA CORNING DIAGNOSTICS CORP) 23. Dezember 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 4, Zeile 43 - Zeile 46 siehe Spalte 10, Zeile 20 - Spalte 11, Zeile 28 siehe Abbildung 3</p> <p>-----</p>	11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Änderungen der Veröffentlichung sind durch die internationale Recherche gekennzeichnet

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/03535

Anforderung an die Recherche angetragenes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitgliedern der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0723146	A	24-07-1996	AT	170004 T	15-09-1998
			CA	2144527 A	31-03-1994
			DE	69320484 D	24-09-1998
			EP	0660936 A	05-07-1995
			JP	8501632 T	20-02-1996
			WO	9407142 A	31-03-1994
			US	5674698 A	07-10-1997
US	5736410 A	07-04-1998			
WO 9503538	A	02-02-1995	EP	0660924 A	05-07-1995
			JP	8504955 T	28-05-1996
			US	5738825 A	14-04-1998
EP 0194132	A	10-09-1986	JP	61217745 A	27-09-1986
			US	5096807 A	17-03-1992
DE 4115414	A	12-11-1992	WO	9221020 A	26-11-1992
			EP	0538428 A	28-04-1993
			JP	6500178 T	06-01-1994
			US	5393401 A	28-02-1995
EP 0519622	A	23-12-1992	US	5156976 A	20-10-1992
			CA	2069538 A	08-12-1992
			JP	7174692 A	14-07-1995

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that proper record-keeping is essential for the transparency and accountability of the organization. The document then outlines the specific procedures for recording transactions, including the use of standardized forms and the requirement for double-checking entries.

The second part of the document addresses the issue of data security. It highlights the need to protect sensitive information from unauthorized access and disclosure. To this end, the document recommends implementing robust security measures, such as encryption and access controls, to safeguard the organization's data.

The third part of the document focuses on the importance of regular audits. It states that audits are a critical component of the organization's internal control system, as they help to identify and correct errors and prevent fraud. The document provides guidance on how to conduct audits effectively, including the selection of audit personnel and the use of audit checklists.

The final part of the document discusses the role of management in ensuring the effectiveness of the internal control system. It stresses that management is responsible for creating a culture of integrity and ethical behavior, and for providing the resources and support needed to implement and maintain the system. The document concludes by reiterating the importance of continuous improvement and the need to regularly review and update the internal control system.